

Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 w czasie infekcji, w fazie odporności i rekonwalescencji podczas przebiegu COVID-19 - doświadczenia własne.

Dr Brygida Beck^{1,2}, Anna Żyła¹, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Mazowiecki Szpital Specjalistyczny Sp. z o.o.¹, Radom, Medyczne Centrum Naukowo-Diagnostyczne BB-Med, Ruda Śląska²

W przypadku infekcji wirusami powodującymi zakażenia układu oddechowego (m.in. wirus grypy, RSV - respiratory syncytia virus) obraz choroby ma różny przebieg w zależności od stanu organizmu gospodarza, począwszy od objawów łagodnych poprzez ciężkie, łącznie z przypadkami śmiertelnymi. Tak jest też w przypadku koronawirusów.

SARS-CoV-2 - wirus z rodziny Coronaviridae z rodzaju Betacoronavirus, otoczony jest osłonką i posiada jednoniciowy RNA. Wszystkie koronawirusy wykazują podobieństwo organizacji i ekspresji ich genomu, który koduje 16 białek niestrukturalnych i 4 białka strukturalne: szczytowe (S), otoczki (E), błonowe (M) i nukleokapsydu (N). Wirusy tej rodziny są pochodzenia odzwierzęcego. Powodują choroby o objawach od łagodnego przeziębienia do poważniejszych, takich jak zespół ciężkiej i ostrej niewydolności oddechowej (SARS), bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej (MERS) i COVID-19 (ang. Coronavirus Disease).

SARS-CoV-2 przenoszony jest między ludźmi głównie drogą kropelkową, ale możliwe jest także przenoszenie pośrednie poprzez zanieczyszczone powierzchnie. SARS-CoV-2 można izolować z próbek z górnych dróg oddechowych, uzyskanych za pomocą wymazów z jamy nosowo-gardłowej, gardła lub z płwociny. Wirus uzyskuje dostęp do komórek gospodarza za pośrednictwem enzymu konwertującego angiotensynę 2 (ACE2), który najbardziej rozpowszechniony jest w płucach. Uważa się, że okres inkubacji wirusa wynosi od 2-14 dni po ekspozycji, przy czym większość pacjentów wykazuje objawy około 4-5 dni po ekspozycji. Okres czasu, w którym chory z COVID-19 zakaża, nie został jeszcze dokładnie ustalony.

Podstawową techniką rozpoznania zakażenia SARS-CoV-2, zgodnie z aktualnymi dowodami naukowymi, jest technika RT-PCR. Wykrywanie obecności materiału genetycznego wirusa jest możliwe tylko w aktywnej fazie choroby, gdy obecna jest replikacja w tkankach, z których materiał został pobrany. Zaletą testów molekularnych jest możliwość potwierdzenia zakażenia we wczesnej fazie, gdy jeszcze nie doszło do produkcji przeciwciał oraz możliwość wykluczenia aktywnej replikacji po przechorowaniu.

Podstawowym mechanizmem zwalczania infekcji SARS-CoV-2 przez układ odpornościowy jest wytwarzanie specyficznych przeciwciał rozpoznających wirusa. Podczas takiej infekcji organizm może wytwarzać przeciwciała rozpoznające wiele epitopów znajdujących się na różnych białkach wirusa. Badania przeciwciał anty-SARS-CoV-2 mogą przyczynić się do identyfikacji osób, które miały kontakt z wirusem i tym samym mogą być pomocne w ocenie stopnia narażenia populacji, ponadto mogą pomóc w podjęciu decyzji o zastosowaniu, egzekwowaniu lub złagodzeniu środków ograniczających rozprzestrzenianie się wirusa.

Skierowane przeciwko białkom szczytowym i białkom nukleokapsydu przeciwciała neutralizujące powstają już w 9 dniu infekcji, wykazując silną odpowiedź neutralizującą.

Serokonwersję w przypadku IgM zaobserwowano już w ciągu 5 dni od wystąpienia pierwszych objawów, a IgG w ciągu 5-7 dni. Na podstawie wciąż nielicznych danych wydaje się, że IgA anty-SARS-CoV-2 pojawiają się około 3-6 dni po wystąpieniu pierwszych objawów. W zależności od zastosowanej metody, serokonwersję można zaobserwować po czasie, którego mediana wynosi 10-13 dni od wystąpienia pierwszych objawów w przypadku IgM i 12-14 dni w przypadku IgG. Maksymalnie serokonwersja zachodzi w czasie 2-3 tygodni w przypadku IgM, 3-6 tygodni dla IgG i w czasie 2 tygodni dla wszystkich przeciwciał. Podczas gdy IgM wydają się zanikać w okolicy 6-7 tygodnia, w tym samym czasie obserwuje się wysoką seropozytywność IgG. Poziomy i chronologiczny kolejność pojawiania się przeciwciał IgM i IgG są wysoce zmienne, co daje podstawy i uzasadnia równoległe wykrywanie obu tych przeciwciał (testy "Total").

Dane z najnowszych publikacji wykazały, że czułość wykrywania przeciwciał "Total" była wyższa niż w przypadku oddzielnych oznaczeń dla IgM i IgG ($p < 0,001$), podczas gdy swoistości były ogólnie porównywalne, gdy stosowano te same metody badań (ELISA, CLMA lub LFIA). Powinno się również podkreślić, że poziom przeciwciał nie jest bezpośrednio skorelowany z ciężkością zakażenia.

Należy pamiętać, że ujemny wynik testu anty-SARS-CoV-2 nie wyklucza całkowicie możliwości zakażenia wirusem. Próbkę surowicy z bardzo wczesnej fazy choroby (przed serokonwersją) mogą dawać wyniki ujemne. Badanie przeciwciał anty-SARS-CoV-2 powinno być interpretowane razem z wynikiem badania RT-PCR (wymaz z gardła/nosogardzieli) - Tabela 1.

Testu tego nie można używać do diagnozowania ostrej infekcji. Należy również pamiętać, że z biegiem czasu miano przeciwciał może się obniżyć i ostatecznie wynik będzie ujemny. Na pytanie jak długo utrzymują się przeciwciała w organizmie i na jakim poziomie będą się kształtować, będziemy mogli odpowiedzieć dopiero po upływie dłuższego czasu.

Tabela 1.

Interpretacja wyników RT-PCR /Anty-SARS-CoV-2.

RT-PCR ujemny/anty-SARS-CoV-2 ujemne	pacjent nie jest zakażony wirusem lub przebył zakażenie w przeszłości, a miano przeciwciał obniżyło się i jest nieoznaczalne
RT-PCR dodatni/anty-SARS-CoV-2 ujemne	pacjent zakażony w tzw „okienku serologicznym” (nie wytworzył jeszcze przeciwciał)
RT-PCR dodatni/anty-SARS-CoV-2 dodatnie	pacjent w ostrej fazie infekcji
RT-PCR ujemny/anty-SARS-CoV-2 dodatnie	pacjent przebył zakażenie w przeszłości

W Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Mazowieckiego Szpitala Specjalistycznego w Radomiu przebadano szereg próbek surowic krwi osób, u których wcześniej potwierdzono infekcje przy pomocy testu RT-PCR. Zaobserwowano jednocześnie obecność przeciwciał u osób, u których nie uzyskano nigdy dodatnich wyników RT-PCR. Badania wykonano przy pomocy testu Elecsys Anti-SARS-CoV-2 firmy Roche Diagnostics na analizatorze cobas 6000. W formacie wykorzystanego do badań testu, wysoką swoistość wykazują przeciwciała anty-nukleokapsydowe, które korelują z neutralizacją i nabytą domniemaną odpornością kliniczną.

Test został tak skonstruowany, by wykrywać przeciwciała o wysokim powinowactwie. Musimy pamiętać, że w odpowiedzi na każdy czynnik zakaźny w organizmie, przeciwciała ewoluują. Kiedy wirus pojawia się po raz pierwszy u danej osoby, jego układ immunologiczny początkowo generuje przeciwciała o niskim powinowactwie do wirusa. To niskie powinowactwo oznacza, że wczesne przeciwciała nie są

w stanie skutecznie wiązać się z wirusem i go wyeliminować. W miarę ewolucji odpowiedzi immunologicznej wytwarzane będą przeciwciała o wysokim powinowactwie (dojrzałe), które wiążą się z wirusem i neutralizują go. Te przeciwciała o wysokim powinowactwie pojawiają się później w trakcie infekcji i są to właśnie te przeciwciała, które wykrywane są za pomocą testu użytego w naszych badaniach. Taka konstrukcja testu minimalizuje ryzyko słabej reaktywności krzyżowej i uzyskania fałszywie dodatnich wyników.

Uzyskane wstępne wyniki naszych badań odzwierciedlają odpowiedź immunologiczną organizmu. Obserwujemy wzrost wartości wskaźnika COI w czasie miesiąca w granicach od 41% do 165% u osób z potwierdzoną przy pomocy RT-PCR infekcją oraz w granicach od 40% do 266% u osób z niepotwierdzoną badaniem RT-PCR infekcją (Tabela 2).

Nasze wyniki potwierdzają również, że poziom przeciwciał nie jest bezpośrednio skorelowany z ciężkością zakażenia (Tabela 3).

Tabela 2.

Zmiany poziomu przeciwciał anty-SARS-CoV-2 (podane w wartościach COI) dla osób z potwierdzoną oraz niepotwierdzoną infekcją wirusem wywołującym COVID-19.

Pacjent	Płeć	Data wykonanego badania RT-PCR SARS-CoV2	Data I oznaczenia przeciwciał anty-SARS-CoV-2	Wynik I oznaczenia przeciwciał anty-SARS Co-V2 (COI)	Data II oznaczenia przeciwciał anty-SARS Co-V2	Wynik II oznaczenia przeciwciał anty-SARS CoV-2 (COI)	Wzrost o %*
Pacjenci z badaniem RT-PCR SARS-CoV-2 dodatnim							
1.	K	01.04.2020	29.04.2020	16,45	1.06.2020	43,64	165%
2.	K	03.04.2020	28.04.2020	83,55	2.06.2020	199,1	138%
3.	M	30.03.2020	7.05.2020	80,55	5.06.2020	167,9	108%
4.	M	29.03.2020	6.05.2020	11,19	19.06.2020	21,38	91%
5.	K	29.03.2020	5.05.2020	61,45	5.06.2020	103,3	68%
6.	K	03.04.2020	4.05.2020	97,7	5.06.2020	162,7	66%
7.	K	31.03.2020	4.05.2020	129,8	5.06.2020	183,6	41%
8.	K	03.04.2020	6.05.2020	105,1	5.06.2020	148,5	41%
9.	K	29.03.2020	5.05.2020	88,59	5.06.2020	108,1	22%
10.	K	29.03.2020	8.05.2020	124,2	10.06.2020	141,8	14%
Pacjenci z badaniem RT-PCR SARS-CoV-2 ujemnym							
1.	K	29.03.2020	6.05.2020	13,78	3.06.2020	50,5	266%
2.	K	30.03.2020	29.04.2020	56,36	29.05.2020	149,5	165%
3.	M	30.03.2020	05.05.2020	82,14	05.06.2020	204,9	149%
4.	M	30.03.2020	12.05.2020	71,11	16.06.2020	145,3	101%
5.	K	10.04.2020	4.05.2020	105,3	5.06.2020	147,8	40%

*% zmiany wskaźnika COI (cut-off index)

Tabela 3.

Występowanie objawów charakterystycznych dla przebiegu COVID-19 u osób z potwierdzoną oraz niepotwierdzoną infekcją wirusem SARS-CoV-2.

Pacjent	Gorączka	Stan podgorączkowy	Oslabienie	Ból gardła	Ból głowy	Kaszel	Katar	Bóle mięśni i stawów	Utrata węchu i smaku	Czas trwania objawów (dni)	Wzrost o %*
Pacjenci z badaniem RT-PCR SARS-CoV2 dodatnim											
1.	NIE	TAK 37,7 °C	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	14	165%
2.	NIE	TAK 37,7 °C	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	14	138%
3.	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	0	108%
4.	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	TAK	7	91%
5.	NIE	TAK 37,7 °C	TAK	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	TAK	5	68%
6.	NIE	TAK 37,7 °C	TAK	NIE	TAK	NIE	NIE	TAK	NIE	14	66%
7.	NIE	TAK 37,7 °C	TAK	TAK	TAK	NIE	TAK	TAK	NIE	14	41%
8.	NIE	TAK 37,7 °C	TAK	TAK	TAK	TAK	NIE	TAK	TAK	14	41%
9.	NIE	TAK 37,7 °C	TAK	TAK	TAK	NIE	NIE	TAK	TAK	14	22%
10.	NIE	TAK 37,8 °C	TAK	NIE	NIE	NIE	NIE	TAK	TAK	14	14%
Pacjenci z badaniem RT-PCR SARS-CoV-2 ujemnym											
1.	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	0	266%
2.	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	0	165%
3.	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	0	149%
4.	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	0	101%
5.	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE	0	40%

*% zmiany wskaźnika COI (cut-off index)